

学校编码: 10384
学号: 21720061152267

分类号_____密级_____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文
人表皮生长因子 hEGF 在螺旋藻
中的表达研究

Expression of hEGF in *Spirulina platensis*

郑晓欢

指导教师姓名: 章军 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 7 月 日

论文答辩时间: 2009 年 7 月 日

学位授予日期: 2009 年 7 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的
研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表
的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规
范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()
课题(组)的研究成果,获得()课题(组)
经费或实验室的资助,在()实验室完成。

(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,
未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

200 年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

200 年 月 日

目 录

中文摘要	1
英文摘要	2
前言	3
1 人表皮生长因子简介与研究进展	3
2 螺旋藻基因工程的研究进展	11
材料和方法	17
1 材料	17
2 方法	21
结果和分析	32
1 含目的基因的螺旋藻表达质粒的构建	32
2 钝顶螺旋藻 (<i>Spirulina platensis</i>) 的转化及鉴定	38
3 外源基因在螺旋藻中的稳定性	42
4 转基因螺旋藻对大鼠急性胃溃疡的治疗修复作用	43
讨论	46
1 hEGF 在螺旋藻中的表达分析	46
2 转 EGF 基因螺旋藻的优点和应用前景	47
3 转基因藻对大鼠乙酸性溃疡的治疗修复实验的分析	48
4 对本研究的进一步设想	48
参考文献	49
致谢	58

CONTENTS

Abstract (In Chinese)	1
Abstract (In English)	2
Preface	3
1 Epidermal growth factor progress.....	3
2 <i>Spirulina platensis</i> progress.....	11
Materials and Methods	17
1 Materials.....	17
2 Methods.....	21
Results and Analysis	32
1 Construction of hEGF expression vector.....	32
2 Transformation and confirmation of <i>Spirulina platensis</i>	38
3 The stability of hEGF in <i>Spirulina platensis</i>	42
4 The curative effect of the transgenic spirulina	43
Discussion	46
1 Expression of hEGF in <i>Spirulina platensis</i>	46
2 The advantage and future application of transgenic spirulina.....	47
3 The curative effect of the transgenic spirulina proved by the acetic acid-induced gastric ulcer in rats.....	48
4 The idea of further study.....	48
References	49
Acknowledgement	58

摘 要

表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor) 是由 53 个氨基酸组成的多肽。因具有多种生物学活性和广泛的临床应用前景, EGF 及其受体家族的研究成为近年来生物研究的热点之一。螺旋藻是一类特殊的原核生物, 它作为一种天然绿色食物, 具有高安全性和高营养价值的特点, 有着巨大的应用开发潜力。本实验的目的在于实现人表皮生长因子在螺旋藻中的表达, 省去下游的分离纯化, 以期开发出外敷产品应用于美容和皮肤烧伤、创伤的治疗、直接口服的美容保健品。

首先, 构建用于转化的供体表达载体。根据螺旋藻密码子的偏嗜性, 设计引物, 用 PCR 技术扩增得到人表皮生长因子基因。利用 *NspI* 和 *SphI* 这两种同尾酶, 经过多步链接、测序, 构建成含有四个串联目的基因的重组载体。然后将此串联片段插入到含有蓝藻源的热休克 *groESL* 启动子、*rbcS* *polyA* 终止区、同源重组片段 *recA* 基因和 *nptII* 基因的质粒中, 构建成供体表达质粒 pKREGF4。

其次, 将构建好的供体表达质粒转化螺旋藻。我们将供体质粒用超声转化的方法转化钝顶螺旋藻, 通过 G418 筛选, 得到三株具有 G418 抗性且生长良好的转化藻株, 分别命名为 EGFA, EGFB, EGFC。以外源片段两侧引物对转化藻株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 证明目的片段已经整合到宿主的基因组 DNA 中。转化藻通过 41℃ 热诱导后, 进行 SDS-PAGE, 通过 Western-blot, 发现 EGFB, EGFC 藻株存在与预期外源目的基因表达产物大小相当的 8.87kD 左右的特异杂交带, 证实特异蛋白的存在。而 EGFA 可能由于外源目的基因表达量过低或者基因未表达, 没有检测到杂交信号。我们选取生长状态较好的转化藻 EGFC 进行大量培养, 为后期验证转基因藻功能的动物实验做准备。

最后, 我们通过乙酸诱导大鼠急性胃溃疡的实验, 初步证明转基因螺旋藻在治疗大鼠急性胃溃疡方面有一定的功效, 转基因藻的治疗效果好于野生藻, 体现了转基因螺旋藻的优越性。

本研究通过超声转化的方法将目的基因人表皮生长因子 hEGF 片段整合到螺旋藻 *Spirulina platensis* 染色体上, 并且从 DNA 和蛋白质水平检测了目的基因的表达情况, 首次尝试了以螺旋藻作为转基因受体表达人表皮生长因子, 为进一步研究开发具有人表皮生长因子功能的转基因螺旋藻产品奠定了基础。

关键词: 人表皮生长因子 (hEGF); 转化表达; 螺旋藻

Expression of hEGF in *Spirulina platensis*

Abstract

Human epidermal growth factor (hEGF) is a 53 amino acid peptide, which acts as a growth factor on a wide variety of cell types. Due to its essential biological function and wide spectrum application on clinic, it is the hot spot to study hEGF and its receptors in the research field of biochemistry and molecular biology. *Spirulina platensis* are a diverse and widely distributed group of prokaryotes with rich protein and nutrition. In recent years there has been rapid progresses on the genetic engineering of spirulina. In this study, the nucleotide sequence of hEGF was obtained by PCR and subcloned into plasmid pUCMT1 which contained groESL promoter, Kanamycin resistance gene(nptII) , recA gene and rbcS-polyA terminator, thus the expression vector pKREGF4 was constructed.

Then this recombinant donor plasmid was transformed into *Spirulina platensis* through ultrasonic treatment and the three transformants were obtained by G418 screening, named EGFA, EGFB, EGFC. Results of PCR showed that the target nucleotide had been genetically integrated into genome DNA of host cell by integration vectors. Further confirmation was made by SDS-PAGE and Western Blot. Results indicated that special 8.87kD protein expressed in transformants EGFB and EGFC was coherent with the aimed protein .

At last, the curative effect of the transgenic spirulina had been proved by the acetic acid-induced gastric ulcer in rats.

In this study, the hEGF had successfully expressed in the *Spirulina platensis*, which gave the basis for the study on transgenic spirulina. It's the first time to use spirulina as host cell to express EGF. In our future research , we hope that we can develop a new health product which not only act the spirulina function but also perform the health effect of EGF.

Keywords: hEGF; express; *Spirulina platensis*

前言

1 表皮生长因子简介

表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor) 是由 Cohen^[1] 于 1960 年首次在小鼠的颌下腺中发现的一种小分子多肽即 mEGF。1975 年^[2] 从人尿中提取出人表皮生长因子, 由于其可抑制胃酸分泌, 又称为抑胃素 (Urogastrone), 现在称为人表皮生长因子(human Epidermal Growth Factor, hEGF), 是由 53 个氨基酸组成的多肽。

人表皮生长因子 (hEGF) 在细胞的分裂与分化等过程中起重要作用。EGF 通过与膜上受体 (EGFR) 结合, 激活受体, 使受体的酪氨酸激酶活性升高, 催化细胞内多种蛋白质底物的酪氨酸残基磷酸化, 启动或维持与细胞增殖有关的一系列生化过程^[3-5]。hEGF 具有促进细胞增殖, 促进细胞核转录活性及激活受体酪氨酸蛋白激酶活性等广泛的功能, 可以用于烧伤, 美容, 胃病治疗、角膜移植手术及肿瘤等方面的治疗和应用^[6-9], 目前已有产品应用到临床实践阶段或在市场上销售。

1.1 表皮生长因子的来源与分布^[10, 11]

EGF 主要来源于内胚层和外胚层的细胞, 如乳腺、表皮、角膜、肝脏、胰腺、神经、羊膜、肾上腺髓质和尿路的上皮细胞。EGF 主要分布于体液如唾液、血液、胃液、精液、前列腺液、羊水、组织液、十二指肠液、尿液、乳汁等体液中。在唾液中 EGF 的平均浓度达 864 ng/L, 人血浆中为 2-4ng/mL^[12]。

1.2 人表皮生长因子的结构

hEGF是由53个氨基酸组成的单链多肽如图A, 等电点(pI)为4.6, 含3个链内二硫键^[13]。3对二硫键分别是: Cys⁶-Cys²⁰, Cys¹⁴-Cys³¹, Cys³³-Cys⁴²。hEGF分子含有4个酪氨酸, 在结构和功能上都具有重要意义。人表皮生长因子hEGF的结构可以分成三个二硫键结合的loop^[14]: A-loop (氨基酸残基6-19), 包含一些不规则肽段; B-loop (氨基酸残基20-31) 形成了一个反向平行的 β 折叠; C-loop (氨基酸残基33-42) 又是一个 β -折叠结构的一部分; 在第四个和第五个半胱氨酸之

间一个32位的天冬酰胺作用为一个铰链。这些loop与氨基端和羧基端的线性结构相连接。hEGF分子的空间结构^[15-17] 可分为相对独立的N端和C端，这两部分较为刚性，分别由两对和一对相对柔性的二硫键相连，因此两部分的的空间位置相对可变，整个分子较为柔性。NN端由1-12氨基酸残基的不规则肽段和一个反向平行的 β 折叠组成（氨基酸残基19-23/28-32）。C端包含一个短的 β 折叠（氨基酸残基36-38/44-46）和48-53氨基酸残基的C端部分，目前尚未有hEGF的精确的空间结构，只有它的分子模型。以上所述如下图所示：

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His Asp Gly
Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn Cys Val Val Gly
Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys Trp Trp Glu Leu Arg

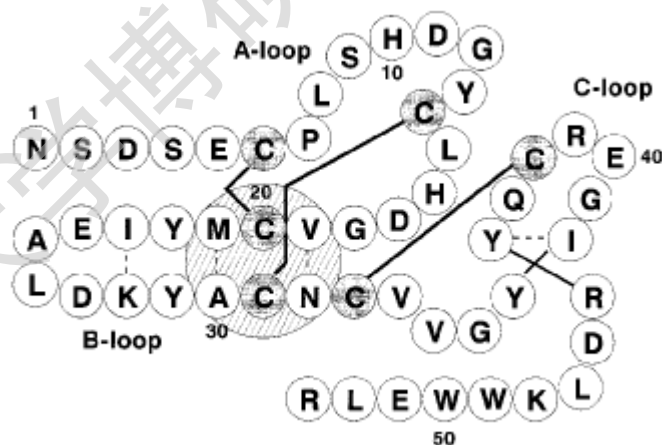


图 A 人表皮生长因子的氨基酸序列^{[14][18]}

Fig.A Human Epidermal Growth Factor.

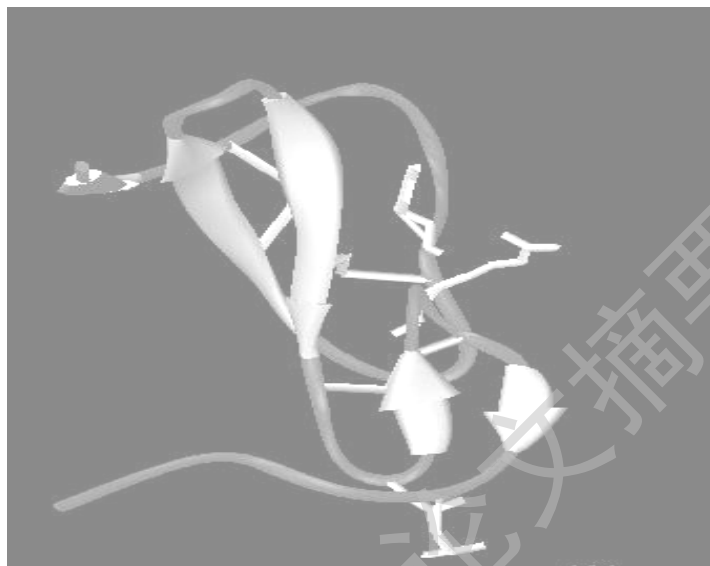


图 B 人表皮生长因子二级结构^[19]

Fig.B The Secondary Structure of human Epidermal Growth Factor.

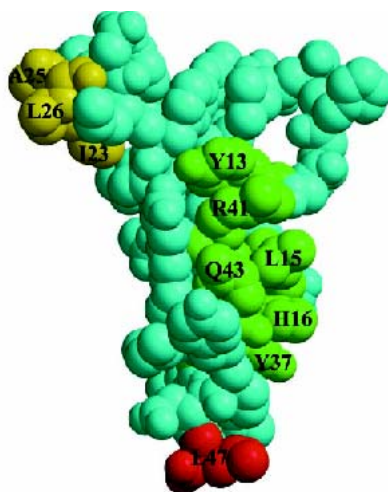


图 C 人表皮生长因子三级结构

Figure C Space-filling Model of the EGF molecule^[20].

图中标有数值的氨基酸残基分布于分子结构表面, 对 EGF 和 EGF 受体的结合起重要作用, 它们分别是: Tyr¹³, Leu¹⁵, His¹⁶, Tyr³⁷, Arg⁴¹, Gln⁴³, Ile²³, Ala²⁵, Leu²⁶ 和

Leu⁴⁷。

1.3 表皮生长因子的作用机理

EGF 通过 EGF 受体家族发挥其功能^[21-25]，该家族由四个酪氨酸激酶受体组成分别命名为 EGFR (ErbB1)，ErbB2 (HER2 或 neu)，ErbB3 (HER3)，ErbB4 (HER4)。在 EGFR1 信号途径中仅包括 EGF-EGFR，也是 EGF 主要的信号途径。EGF 受体 (EGFR)^[26]是一个单链的跨膜蛋白，由胞内的酪氨酸结构域、单个跨膜结构域和细胞外结构域组成，这三个结构域包括了 EGF 结合位点、EGFR 二聚化与磷酸化的位点。EGF 通过与 EGFR 结合，激活受体激酶活性，随即引起一系列磷酸化级联反应，通过信号转导作用将胞外信号转换为胞内化学或物理的信号，在细胞内传递中构成一个复杂的代谢网络，终致细胞生理和/或基因表达的改变，控制细胞的代谢、生长、分化和癌变^[27-30]等。

EGF 介导的信号通路是一种复杂的过程，具体作用机制^[31-35]如下：

EGF 在细胞外与其受体结合并引起构象变化，但是单个跨膜 α 螺旋无法传递这种构象变化，因此 EGF 的结合导致 EGFR 受体二聚化形成同源或异源二聚体，从而在二聚体内彼此相互磷酸化 EGFR 受体的胞内肽段的酪氨酸残基，实现 EGFR 受体的自磷酸化。自磷酸化的结果是激活受体的酪氨酸蛋白激酶活性，磷酸化的酪氨酸残基可以被含有 SH2 结构域的胞内信号蛋白所识别并与之结合，由此启动信号转导^[36]。这些结合蛋白或信号蛋白其中一类是接头蛋白，如生长因子受体结合蛋白-2 (Grb2)，另一类是在信号通路中有关的酶，如 GTP 酶活化蛋白 (GAP)、磷脂酰肌醇代谢有关的酶磷脂酶 C- γ (PLC γ) 以及 Src 类的非受体酪氨酸蛋白激酶 Shc 和其他分子。EGF 介导的主要信号通路包括 RAS 和 MAP 激酶途径^{[37][38]}；JAKS-STAT 途径^[39-41]；磷脂酰肌醇信号通路^[42-46]和通过 Ca²⁺依赖性蛋白激酶 C(PKC)的途径^[47-49]。EGF 各种信号通路相互影响，交错连接，共同构成了 EGF 的作用途径。

EGF 可以诱导 ErbB 受体家族中一些成员的同源或异源二聚化：ErbB1 自身的二聚化，ErbB1 与 ErbB2、ErbB3、ErbB4 的异源二聚化及 ErbB2-ErbB4 的异源二聚化^[50-51]。

以上各种信号途径在生物学过程中如细胞的增殖，凋亡，循环以及有丝分裂和肿瘤中发生，在不同靶基因的转录调控，肌动蛋白重组等方面都有一定的作用，

这些共同组成了 EGF 的作用网络。

活化的 EGF-EGFR 复合物一方面主要执行以上功能,另一方面则进行 EGFR 的调节^[52]:其中一部分在胞吞过程中被细胞内体分选不能再进行循环而最后进入溶酶体,大部分在溶酶体中被降解,从而导致细胞表面 EGF 受体浓度降低,称为受体下行调节(receptor down-regulation)^[53, 54, 55];而另一部分在激活的蛋白激酶 C 催化下重新循环回到细胞膜上,进行下一轮的反应。细胞通过以上方式实现了 EGF 受体的调节。

1.4 人表皮生长因子的作用

EGF 的主要功能不仅是许多细胞如上皮细胞,纤维原细胞和内皮细胞的有丝分裂原^[56],还具有调节胃酸分泌的作用^[57-59],过去曾称为尿抑胃素。现知 EGF 具有广泛的功能。

1) 促进细胞增殖、分化、凋亡及细胞的循环^[60-62]。EGF 作用于许多细胞,刺激分裂增殖。EGF 主要来源于内胚层和外胚层的细胞,诸如乳腺,表皮,角膜,肝脏,胰腺,神经,羊膜,肾上腺髓质和尿路的上皮细胞。可促进组织、角膜上皮组织及胃、肺、气管上皮细胞的生长繁殖。组织培养时,促进人体皮肤上皮细胞、角膜上皮细胞和哺乳动物上皮细胞生长,加速创伤愈合,可用于治疗皮肤烧伤,角膜修复和化妆美容等方面。

2) 促进细胞核转录活性^[63, 64]。EGF 可以调节基因 DNA 中富含 GC 的元件,称为胃泌素 EGF 反应元件,后者能与转录因子 SP1 和胃泌素 EGF 反应蛋白形成复合物,增强胃泌素基因上游的启动子,促进胃泌素的基因转录。EGF 这种促进转录的作用可以是直接的,也可以通过膜受体的信号转导作用而进行。可加速胃溃疡(gastric ulcers)的治疗和抑制胃酸(gastric acid secretion)的分泌。

3) EGF 可激活其受体的酪氨酸蛋白激酶活性(TPK),这在肿瘤的发生发病过程中具有重要作用^[65]。在乳腺,肺,头及颈部的肿瘤中通常发现 EGFR 和 ErbB2 受体的过量表达^[66, 67]。多种癌基因可以编码 TPK,利用定位突变的方法已经证明:TPK 磷酸化与否对酶活性有重要调节作用,高活性的 TPK 可促使细胞增殖或癌变。在肿瘤治疗中,可将 EGF 及其受体作为治疗的靶分子,通过单克隆抗体,药物抑制受体酪氨酸蛋白激酶以及基因封闭等手段阻断 EGF 受体的激活。

4) 人表皮生长因子可以应用于治疗的病症集合

- (1) 增强治愈糖尿病的并发症脚气病 (diabetic foot ulcers) [68-70]。
- (2) 重组人表皮生长因子可用于治疗鼻中隔黏膜糜烂[71]。
- (3) 重组人表皮生长因子(rhEGF)对家兔小肠吻合口愈合有促进作用[72]。
- (4) 重组人表皮生长因子在皮肤磨削术中的应用[73]。
- (5) 重组人表皮生长因子对明胶海绵贴补治疗外伤性鼓膜穿孔有疗效[74]。
- (6) 重组人表皮生长因子可应用于吸入性损伤的治疗及促进气管黏膜愈合的作用,临床上运用 EGF 防治新生儿呼吸窘迫综合症[75]。
- (7) 人表皮生长因子对体外培养的人牙髓细胞(HDPCs) DNA 合成及细胞周期的影响,具有促进 HDPCs 的 DNA 合成和分裂增殖的作用[76]。
- (8) 重组人表皮生长因子治疗压疮(又称褥疮) [77]。
- (9) 人表皮生长因子局部外用对乳腺癌放疗皮肤反应有防治作用[78]。
- (10) 表皮生长因子 (EGF) 对人肝癌细胞 EGFR/DNA 的表达有影响[79]。
- (11) EGF 能明显增加滋养细胞的基础孕酮和雌二醇的分泌,但对人绒毛膜促性腺激素 (hCG)诱发的孕酮分泌无明显促进作用,揭示 EGF 对胎盘的内分泌活动发挥一定的调控作用[80]。
- (12) 表皮生长因子不仅可以预防无水乙醇、缺血再灌注以及阿司匹林等刺激所造成的胃黏膜损伤,而且可以促进乙酸烧灼所致溃疡及胃手术切口的愈合[81]。
- (13) 观察肿瘤病人唾液和荷瘤动物血清中表皮生长因子 (EGF)的含量可研究肿瘤与 EGF 的关系[82]。
- (14) EGF 长期作用诱导广泛的基因表达变化,在所检测的 4096 种人类基因中,有 855 种发生了变化,这些表达变化的基因参与细胞的能量代谢、生物合成、细胞周期调控及受体酪氨酸激酶和 G 蛋白耦连受体信号转导等细胞反应,其中最显著的变化趋势是 GPCR 及其相关蛋白基因表达的下调[83]。
- (15) 在临床上的应用 EGF 可用于多种疾病的治疗:眼科角膜损伤、白内障切除后角膜移植,皮肤烧伤与创伤,外伤性皮肤溃疡、口腔溃疡、胃肠道溃疡以及神经胶质瘤、鳞状细胞癌及宫颈炎等具有明显的疗效。
- (16) 在日用化工上的应用 EGF 可以用来制备高质量的化妆品。实践证明,添加 EGF 的化妆品效果非常好,且具有高度的安全性[84]。

(17) 在畜牧业上的应用鼠 EGF 被用作羊毛脱毛剂, 而马 EGF 则可促进马外伤的愈合^[85]。

综上所述, EGF 研究表明其特殊的生物学效应决定了它的广泛应用, 无论在生物化妆品还是医疗卫生领域, EGF 都发挥着重要的作用, 所以其具有广泛的应用前景。hEGF 在以下几个应用方面中更有前景, 分别是: 化妆品领域, 皮肤创伤、烧伤及手术后伤口愈合中的应用; 胃溃疡的治疗; 眼角膜修复等眼疾和肿瘤的治疗方面。

1.5 人表皮生长因子基因工程的研究进展

自从 1975 年人表皮生长因子发现以来, 因为其作用的广泛性, 一直为人们所关注。近年来由于它与其受体家族之间的相互关系使之成为研究热点之一。人们已经通过不同的途径来分离和提取 hEGF: 从组织提取 hEGF; 重组或人工合成的 hEGF 表达提取, 但前者的成本比较高、工艺较复杂而且得率远远不能满足市场的需求, 所以人们采用通过化学合成的方法或是不同的宿主来表达生产 hEGF: 目前表皮生长因子的生产方式: 基因克隆→基因工程菌→生物反应→清液制备→EGF 浓缩→EGF 纯化→高纯 EGF 制备→成品。

迄今人们已经在 *E.coli*^[86]、*Corynebacterium glutamicum*^[87]、酵母^[88, 89]、枯草杆菌 *BS9920*^[90]、*Bacillus brevis*^[91]、鱼腥藻 *Anabaenasp.PCC7120*^[92]、聚球藻 *Synechococcus sp.PCC7120*^[92] 和 *Yarrowia lipolytica*^[93] 进行了表达。选用的载体各有特色。

目前人表皮生长因子售价约为每克纯品 30 万港币 (折合人民币 32.4 万元), 由于其生产具有巨大的经济效益和应用前景, 很多企业和研究机构都在致力于 hEGF 的基因工程产品研究和开发, 而且人表皮生长因子的基因工程产物成为“863 计划”的重要项目之一, 进一步推动了它的发展。目前许多国家已经批准 hEGF 作为基因工程药物进入 I 期临床试验或者成为商品^[94]。在我国人表皮生长因子研究生产也是热点之一。1999 年 12 月 30 日中国医科院基础研究所已获重组人表皮生长因子软膏临床试验批件, 2000 年 5 月 25 日获得重组人表皮生长因子滴眼液生产批号。军事医学科学院生物工程研究所用于创伤修复的 rhEGF 冻干粉剂已于 2000 年 4 月获得国家一类新药证书(2000S-11 号)^[95], 中国科学院植

物研究所和化冶研究所承担的 863 项目中 rhEGF 在蓝藻中的表达^[92]。我国药品生物制品检定所对国家一类新药“重组人表皮生长因子”的质控标准研究中建立了 BalB/c3T3 细胞株/MTT 比色生物学活性测定模型并制备了其国家标准品^[96]。此外很多企业也在进行重组人表皮生长因子的生产如杭州天目药业, 成都华神集团股份有限公司, 桂林华诺威基因药业有限公司等。目前的主要产品为眼药制品, 烧伤制品和化妆品。

1.6 hEGF 在美容化妆品中的应用及其前景

EGF 不仅具有促进皮肤和黏膜创伤的愈合、防治溃疡及消炎镇痛等方面的作用, 而且能有效地促进和调节表皮细胞的生长与增殖。因此, EGF 对保护和疗养皮肤、黏膜具有十分独特的功效。除了用于各种医疗药品(如: 国家一类新药外用冻干鼠表皮生长因子, 表皮生长因子滴眼液, 外用冻干重组人表皮因子制剂等) 外, EGF 在护肤保健化妆品中也具有广泛的应用价值和市场前景。

比天然内源 hEGF 相对价廉的基因重组 hEGF 更适合用于护肤美容化妆品中。添加了 hEGF (一般为 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$) 的美容化妆品可促进皮肤新细胞的产生, 同时增加其他内源性生长因子的含量, 促进细胞分泌透明质酸和糖蛋白, 合理调整皮肤结构, 延缓皮肤衰老, 减少皱纹, 抑制粉刺和青春痘生长并具有增白等作用。研究还发现含 hEGF 美容化妆品能使受损皮肤快速修复, 使皮肤青春光润, 富有弹性。比如, 含 hEGF 的保养护肤品——酵素洁面乳的配方为(w/ %): 氢化羊毛酯 1.5, 甘油 6, 金楼梅提取液 6, 柠檬酸 0.01, 增溶剂 0.1, 香精 0.1, hEGF 粉末 0.000 01, 纯净水加至 100。

在重组的胞外分泌型高产量质粒表达 hEGF 技术的基础上, 浙大生物工程系试开发了含重组 hEGF 的保养护肤化妆品和重组 hEGF 美容因子(冻干粉), 经应用试验表明产品在消除细小皱纹、预防皮肤老化、保持皮肤润泽、柔软与富有弹性等方面具有显著效果。另外含 hEGF 的发用化妆品能刺激头皮血液循环, 改善表皮供养源, 防止头发干涩、枯黄与异常脱落。

研究还发现 hEGF 与肽类化合物和透明质酸等保湿因子具有优良的正协同作用, 因此在配制含 hEGF 化妆品中应考虑添加天然肽和透明质酸, 起到保护 hEGF 生物活性、提高 hEGF 透渗性和有利皮肤吸收 hEGF 的作用。研究也表

明, hEGF 的用量应控制合理范围, 对表皮肿瘤及其引起的溃疡坏死患者禁用。

hEGF 是目前发现的热、酸稳定性最高的生物活性多肽之一, hEGF 半衰期较长。在我国美容化妆品市场快速增长的良好态势下, 含 hEGF 美容化妆品具有广阔的市场潜量, 由此引入生物美容的新观念与新时尚, 引发美容化妆品行业的又一次革命。

2 螺旋藻基因工程的研究

2.1 螺旋藻简介

2.1.1 螺旋藻的形态与分类学

螺旋藻(*Spirulina*)在分类学上属于蓝藻门,颤藻纲,螺旋藻属,是一种多细胞、微型、不分枝、无异形胞的螺旋状体,靠分裂增殖,光合自养生物,生长于热带高温的碱性湖水中,在地球上已有 35 亿年的历史,是现存最古老的植物之一.虽然螺旋藻有 50 多种,而目前大规模培养的只有极大螺旋藻(*S.maxima*)与钝顶螺旋藻^[97](*S.platensis*)。

2.1.2 螺旋藻的发现和食用历史

早在 16 世纪前,非洲乍得和中美洲墨西哥的居民就已把螺旋藻作为他们的食物,他们大多长寿,体格健壮。到 20 世纪 60 年代,人们才开始发现并重视这种神奇的藻类。1967 年,法国的 clement 博士和比利时的 Jean Leonod 第一次分离出乍得湖产的螺旋藻,并在实验室培养实验。1937 年墨西哥人通过大量的人体实验,证实螺旋藻没有毒性和副作用,可作为食品和饲料使用。随后,螺旋藻理想的蛋白质标准被美国的食物蛋白咨询公司和联合国粮农组织(FAO)正式确认,并向全世界推荐发展螺旋藻。1993 年在摩纳哥首次举行的螺旋藻世界大会一致认为螺旋藻是人类未来理想的食品。目前美国、法国、日本等国家均用螺旋藻来补充日常营养,防治各种疾病。

2.1.3 螺旋藻的化学组成及营养保健价值

螺旋藻的蛋白质含量占 60%-70%,相当于牛羊肉的 3~4 倍,小麦、大米的 8~

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库